

# ÖSSZEHASONLÍTÓ MÉRÉSEK L-ASZKORBINSAV MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSÁRA

VÁMOS KÁROLYNÉ\*

A C-vitamint, mint skorbutellenes anyagot már a század elejétől ismerik. Azóta ezen hatásán kívül, számos más, a szervezetben kifejtett fontos szerepe nyert bizonyítást, a folyamatok mechanizmusának tisztázása nélkül. Számos szerző hívja fel a figyelmet arra, hogy a szervezet több biológiai folyamata károsodhat a hiányt meg nem közelítő, de a szükségesnél alacsonyabb vitamin ellátottság esetén. Újabban ezen hatásokat a „vegyes funkciójú” oxidáz típusú enzimek által katalizált folyamatok gyorsításával próbálják összefüggésbe hozni [1].

Szent-Györgyi [2] Pauling [3] és sok más kutató a szervezet általános védekező képességét hozzák összefüggésbe a C-vitamin ellátottsággal (2, 3).

A napi C-vitamin-szükséglet több tényezőtől függ. Selye szerint pl. a szervezetet érő különféle stresszek — a stressz szót alkalmazva mindenféle fizikai és lelki ingerrel kapcsolatban — pl. a hőmérséklet ingadozáshoz való alkalmazkodással együttjáró nagyobb vitaminürítés, a szénhidrát- és fehérjefogyasztás hatása a C-vitamin értékesülésére, mind hozzájárulnak a magasabb vitaminszükséglethez.

A C-vitamin fenti hatásának sokrétűsége miatt az utóbbi években felvetődött a szükséglet revidálásának kérdése, melyet korábban 10-20 mg/nap értékben adtak meg. Bizonyítást nyert, hogy a napi 15 mg-nál — amely mennyiség már elegendő a skorbut kivédéséhez — lényegesen nagyobb mennyiségű vitamin fogyasztása ajánlatos, a stressz hatások okozta veszteségek pótlására, valamint a szervezetbe jutó idegen anyagok detoxikációjának elősegítésére.

Mai ismereteink szerint a szükséges napi adag 30-125 mg között van. Annyira ingadozik, hogy a kanadai Lionel Brandley Pett szerint illuziórikus törekvés a napi szükséglet pontos értékeinek meghatározása [2]

Mindezek figyelembevételével érthető, hogy az utóbbi időkben a C-vitamin iránti tudományos érdeklődés középpontba került.

A különböző anyagok C-vitamin-tartalmának mérésével számos közlemény foglalkozik. A meghatározások nagy száma ellenére nincs a kérdés megnyugtató módon lezárva.

Számos szerző az oxidimetriás eljárásokat azért veti el, mert ezzel az aszkorbinsavat kísérő, vitaminhatást nem mutató anyagokat is mérjük. Ezeknek az ún. „reduktionoknak” a redoxpotenciálja azonban az aszkorbinsav\*/dehidroaszkorbinsavnak\*\*

\* Kémia Tanszék

\* továbbiakban AS

\*\* DAS

megfelelő 0,36 V értéknél pozitívabb. Ezért zavaró hatásuk kiküszöbölhető oly módon, hogy olyan reagenst választunk az AS mérésére, melynek oxidáló ereje még elegendő a vitamin mérésére, de a zavaró anyagokkal már nem képes reakcióba lépni.

A kálium-ferri-cianid megfelel az előbb vázolt feltételeknek és egy korábbi közleményünkben már beszámoltunk arról, hogy megfelelő körülmények között az AS-tartalommal arányos intenzitású „berlinikék” színreakció hozható létre, mely alkalmas a vitamintartalom mérésére. Megállapítottuk, hogy 0,15—1,0 mg AS határok között szoros korreláció áll fenn az oldat fényelnyelése és a vitamintartalom között, az összefüggés lineáris [5].

## KÍSÉRLETEK LEÍRÁSA

Jelen kísérleteinkben módszerünket két, a gyakorlatban elterjedten használt eljárással hasonlítottuk össze: a jodometriás és Tillmans-féle titrálásokkal [6, 7].

A meghatározási módok összehasonlítását először zavaró anyagot nem tartalmazó AS modelloldattal végeztük el. Az volt a célunk ugyanis, hogy tiszta oldatban megállapítsuk a párhuzamos mérések hibáját.

25 mg AS-at tartalmazó oldatból 5 párhuzamos beméréssel, mind a három vizsgálati módszerrel meghatároztuk az oldat AS tartalmát. A mérési adatokat, valamint az ezekkel kapcsolatos számításainkat a 1. táblázat tartalmazza.

A berlinikék színreakción alapuló módszer a táblázatokban „fotometriás” megjelöléssel szerepel.

A természetes anyagok zavaró hatásának felmérésére, az összehasonlítás következő lépéseként, elsősorban fehérjét tartalmazó sajtextraktumot, ill. AS-at nem tartalmazó meggylevet adtunk ismert AS tartalmú oldatokhoz.

### 1. TÁBLÁZAT

*Az AS meghatározási módszerek összehasonlítása  
modell oldatokon*

| Mérési<br>módszer | Aszkorbin-<br>sav tart.<br>mg %           | Számtani átl.<br>$\bar{x}$ | Szórás<br>$s$ | Relatív hiba<br>$v\%$ | Egyedi<br>érték<br>ingadozás<br>$\pm 2s$ | Megbízható-<br>sági inter-<br>vallum<br>$\bar{x} \pm 2s$ |
|-------------------|---|----------------------------|---------------|-----------------------|--|--|
| Jodometriás       | 24,69<br>25,07<br>25,00<br>24,85<br>24,88 | 24,89                      | 0,147         | 0,60                  | $\pm 0,294$                              | 24,60—25,18  |
| Tillmans-<br>féle | 24,70<br>24,88<br>24,51<br>24,33<br>25,00 | 24,68                      | 0,274         | 1,11                  | $\pm 0,548$                              | 24,13—25,23  |
| Fotometriás       | 24,54<br>24,99<br>24,72<br>24,54<br>24,99 | 24,76                      | 0,218         | 0,88                  | $\pm 0,436$                              | 24,32—25,20  |

A fehérje anyagok zavaró hatása elsősorban abból adódik, hogy maradéktalanul nem, vagy csak igen körülményesen távolíthatók el az oldatból és a zavaros oldatban a meghatározás esetleg bizonytalanra válik.

A színes meggylével dúsított minták vizsgálatával azt kívántuk megállapítani, hogy hatással bír-e ez az egyéb redukáló anyagot is tartalmazó anyag az AS mérési módszerekre, másrészt színes oldatban a meghatározás milyen pontos. Eredményeinket a 2. és 3. táblázatok tartalmazzák.

## 2. TÁBLÁZAT

*Sajtextraktumot tartalmazó oldatban az AS meghatározási módszerek összehasonlítása*

| Mérési módszer | Aszkorbin-sav tart. mg%                   | Számtani átl. $\bar{x}$ | Szórás $s$ | Relatív hiba $v\%$ | Egyedi érték ingadozás $\pm 2s$ | Megbízhatósági intervallum $\bar{x} \pm 2s$ |
|----------------|---|-------------------------|------------|--------------------|---------------------------------|---|
| Jodometriás    | 24,92<br>24,89<br>24,66<br>24,09<br>24,35 | 24,75                   | 0,36       | 1,47               | $\pm 0,722$                     | 23,86—25,30                                 |
| Tillmans-féle  | 24,07<br>23,52<br>23,40<br>24,22<br>23,59 | 23,77                   | 0,326      | 1,37               | $\pm 0,652$                     | 23,12—24,42                                 |
| Fotometriás    | 24,78<br>24,92<br>24,86<br>24,55<br>24,73 | 24,75                   | 0,142      | 0,88               | $\pm 0,284$                     | 24,48—25,04                                 |

A táblázatokban a mérési adatok mellett feltüntetjük a matematikai statisztikai értékeléshez szükséges adatokat [4]:

- a) számtani átlagot
- b) szórást

Mivel kis mintaszám volt a „korrigált empirikus szórás”-t képeztük az alábbi képlettel

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x)^2}{(n-1)}$$

- c) relatív hiba

$$V\% = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}}$$

- d) Képeztük a  $2s$  értéket, és segítségével számítottuk a megbízhatósági intervallumot. Így megállapítottuk, hogy 95%-os statisztikai biztonsággal milyen tartományba esnek a párhuzamos mérések adatai.

A 4. táblázatban a mérések pontosságát tüntettük fel, ezt a valódi érték és a szám-

### 3. TÁBLÁZAT

Meggylevet tartalmazó oldatban az AS meghatározási módszerek összehasonlítása

| Mérési módszer | Aszkorbin-sav tart. mg%                   | Számtani átl. $\bar{x}$ | Szórás $s$ | Relatív hiba $v\%$ | Egyedi érték ingadozás $\pm 2s$ | Megbízhatósági intervallum $\bar{x} \pm 2s$ |
|----------------|---|-------------------------|------------|--------------------|---------------------------------|---|
| Jodometriás    | 26,50<br>26,75<br>26,75<br>26,90<br>26,30 | 26,65                   | 0,236      | 0,885              | $\pm 0,472$                     | 26,18—27,12                                 |
| Tillmans-féle  | 27,10<br>26,70<br>27,05<br>27,50<br>27,38 | 27,14                   | 0,311      | 1,189              | $\pm 0,622$                     | 26,52—27,76                                 |
| Fotometriás    | 24,80<br>24,76<br>24,43<br>24,90<br>24,65 | 24,70                   | 0,175      | 0,707              | $\pm 0,350$                     | 24,35—25,05                                 |

### 4. TÁBLÁZAT

AS mérések pontossága különböző oldatokban

| Módszer    | Minta | Modell 25 mg- $\bar{x}$ | Sajtban 25 mg- $\bar{x}$ | Meggylében 25 mg- $\bar{x}$ |
|------------|-------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Jodometria |       | — 0,12                  | — 0,42                   | + 1,65                      |
| Tillmans   |       | — 0,35                  | — 1,23                   | + 2,14                      |
| Fotometria |       | — 0,24                  | — 0,24                   | — 0,30                      |

tani középérték közötti különbség megállapításával nyertük. Ha  $V$  a valódi érték, akkor a módszer hibáját ( $\Delta$ ) a

$$\Delta = V - \bar{x}$$

különbség adja. Ezt a hibát a valódi érték százalékában is kifejezhetjük:

$$\Delta\% = \frac{V - \bar{x}}{V} \cdot 100.$$

### A KÍSÉRLETEK KIÉRTÉKELÉSE

A zavaró anyagot nem tartalmazó, modell oldatokra vonatkozó méréseinkkel megállapítottuk a párhuzamos mérések hibáját.

Az 1. táblázat adatai szerint ilyen körülmények között megközelítőleg azonos AS értékeket kaptunk mind a három eljárással.

A módszerek érzékenységeinek jellemzésére kiszámítottuk a szórást. Ezen adatok szerint a jodometriás módszer szórása a legalacsonyabb, ezért a továbbiakban ezt választottuk a matematikai összehasonlítás alapjául. Felhasználtuk az  $F$ -próbát annak elbírálására, hogy 10%-os szignifikancia szinten ( $\alpha/2 = 0,05$ ) a módszerek pontossága eltér-e egymástól [4].

$$\frac{s^2 \text{ fotometria}}{s^2 \text{ jodometria}} = 2,1992 < F_{0,05}(4,4) = 6,39.$$

Modell oldatokban tehát a két módszer közötti eltérés nem szignifikáns.

$$\frac{s^2 \text{ Tillmans}}{s^2 \text{ jodometria}} = 3,472 < F_{0,05}(4,4) = 6,39.$$

Tehát a jodometriás és Tillmans szerinti titrálások ugyancsak nem különböznek egymástól jelentős mértékben, a két eljárás egyformán pontos.

A mért adatokból és a matematikai számításokból tehát megállapítható, hogy zavaró anyagot nem tartalmazó oldatokban is van eltérés a három eljárással kapott AS értékek között, de a különbség 95%-os statisztikai biztonságot feltételezve nem szignifikáns közöttük, a tényleges értéket mindkettő ugyanolyan pontosan adja meg.

A természetes anyagok zavaró hatásának felmérésére vonatkozó vizsgálat sorozatból megállapítható, hogy a módszereknél a szórás és relatív hiba értékei magasabbak, mint a korábban elemzett, kizárólag AS-at tartalmazó oldatokban. Ilyen körülmények között a vitamintartalmat legkisebb relatív hibával a mi módszerünkkel tudtuk mérni (mind a kétféle adalékanyagnál 1% alatt).

Mivel az oldatok adalékanyagokkal is ugyanolyan mennyiségű AS-at tartalmaztak, mint modell oldatokban, a mért mennyiségek és a matematikai jellemzők összevethetők a 1. táblázat azonos értékeivel.

Az adatok matematikai kiértékelésére elvégeztük a  $t$  próbát. 10%-os megbízhatósági szinten ( $\alpha/2 = 0,5$ ) az alábbi összefüggés felhasználásával:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{R_1 + R_2},$$

ahol  $\bar{x}_1$  és  $\bar{x}_2$  a két módszer számtani középértéke  
 $R_1$  és  $R_2$  a mérések terjedelme.

| Módszer                                 | Alapanyag | Sajtextraktum                                     | Meggyélé   |
|---|-----------|---|--|
| Jodometria<br>Tillmans m.<br>fotometria |           | nem szignifikáns<br>határeset<br>nem szignifikáns | szignifikáns<br>szignifikáns<br>nem szignifikáns |

A matematikai értékelés megmutatta:

1. Modell oldatokhoz képest a Tillmans-féle módszert az adalékanyagok jelentősen befolyásolták.
2. A két alkalmazott anyag közül a fehérje kevésbé zavart, mint a sok telítetlen kötést és egyéb redukálható csoportot tartalmazó színes adalékanyag.
3. Fotometriás méréssel a változás mindkét anyaggal lényegtelennek bizonyult. A bevitt 25 mg AS-at 0,25 mg eltéréssel mértük vissza.

A 4. táblázatban az elméletileg bevitt és a különböző módszerekkel mért AS értékeket vetjük össze. Ezek az adatok ugyancsak az elmondottakat látszanak igazolni.

Módszerünket a redukáló tulajdonságú zavaró anyagokon túl, a természetes anyagok saját színe nem zavarja, mivel a standardhoz is hozzáadunk a mérendővel azonos mennyiségű extraktot, ezáltal ezt a szint a fotométer nullapontjának beállítása-  
sakor kompenzáljuk. Másodsorban módszerünk érzékenysége sokkal nagyobb, mint az eddigi eljárásoké, 1-5 cm<sup>3</sup> kivonatot 100 cm<sup>3</sup>-re hígítunk a fényelnyelés mérése előtt (míg a másik két módszerrel a tömény kivonatot titráljuk). Ilyen kis koncentrációban a legtöbb természetes anyag saját színe elhanyagolható.

Összehasonlító méréseinket összegezve megállapítottuk, hogy míg idealizált körülmények között — a természetes anyagokban levő zavaró anyagok kizárása mellett — több módszer, viszonylag elfogadható relatív hibával adja meg a C-vitamin-tartalmat, addig kísérő anyagok jelenlétében az klasszikus eljárások megbízhatatlanokká válnak.

#### IRODALOM

1. Bakes, E. M.: Am. Clin. Nutr., 20 583. (1967.)
2. Böttcher, H. M.: Vitaminok könyve, Gondolat Kiadó, Budapest, (1967.)
3. Pauling, L.: Vitamin C and the common cold, W. H. Feeman and Co. (1970.)
4. Felix M. — Blaha K.: Matematikai statisztika a vegyiparban, Műszaki Kiadó, Budapest, (1964.)
5. Vámos, E.—Gabor, E.: Die Nahrung, 17. 409. (1972.)
6. Tillmans, I.: Z. Unters. Lebensmitteln, 60. 34. (1930.)
7. Schulek, E.,—Floderer, I.: Ang. Chemie, 52, 615, (1939.)

#### COMPARATIVE MEASUREMENTS FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF L-ASCORBIC ACID

É. Vámos

As a consequence of the reducing property of ascorbic acid (AA), its determination is recommended with a solution of K<sub>3</sub>Fe/CN<sub>6</sub>, a substance with nearly the same redox potential. The disturbing effect of „reductors” not exhibiting the vitamin C effect is thereby minimalized.

The intensity of the Prussian blue colour reaction in the solution displays a close correlation with the AA content, the correlation being linear for the AA range 0.1—1.0 mg.

The procedure is compared with two methods accepted in practice as fast procedures: iodometric and Tillmans titrations. The accuracy is characterized by the scatter and the relative % error. The methods are compared mathematically with the F and t tests.

It was found that the AA contents of model solutions and solutions containing protein extracts are given within the same limiting error with a statistical confidence of 95% by the iodometric and the proposed method. After elimination of interferences and objective evaluation, the new method correctly gives the AA content of coloured morello juice.

#### VERGLEICHENDE MESSUNGEN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER L-ASKORBINSÄURE

É. Vámos

Verfasserin empfiehlt die Bestimmung der AS mit einer — infolge ihrer reduzierenden Eigenschaft über ein annähernd gleiches Redoxpotential verfügenden Substanz — Kalium/(Hexacyanoferrat (III.)) — Lösung. Hiedurch wird der störende Einfluss der keine Vitamin C—Wirkung zeigenden „Reduktoren“ auf ein Minimum reduziert.

Ihren Untersuchungen nach zeigt die Intensität der in der Lösung zustandegebrachten Berlinerblau-Farbreaktion eine enge Korrelation zum AS-Gehalt; der Zusammenhang zwischen ihnen ist innerhalb der Grenzen von 0,1 — 1,0 mg AS linear.

Das Verfahren wird verglichen mit zwei in der Praxis als Schnellverfahren akzeptierten Methoden: mit der jodometrischen und der TILLMANSschen Titrierung. Die Genauigkeit wird mit der Streuung bzw. mit dem relativen %-uellen Fehler charakterisiert. Der mathematische Vergleich der Methoden geschah mit der F- und der t-Probe.

Es wurde festgestellt, dass die Menge des AS—Gehaltes in Modelllösungen sowie in Eiweissextrakt enthaltenden Lösungen mit 95-%iger statistischer Sicherheit innerhalb identischer Fehlergrenzen jodometrisch und auch mit der von der Autorin empfohlenen Methode erfassbar ist. Den AS-Gehalt des farbigen Sauerkirschensaftes zeigt wegen der Eliminierung der störenden Stoffe und der objektiven Auswertung die neue Methode richtig an.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ Л—АСКАРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Е. Вамош*

Автор предлагает метод определения аскорбиновой кислоты с помощью раствора кияал (гексацианоферрат/III), который по своей восстановительной способности является веществом очень сходной редукционной потенциальности. При этом снижается до минимума ингибиторное влияние «редуктов», не отражающих влияние витамина С.

По нашим данным, интенсивность вызванной цветной реакции берлиновой лазури показывает строгую корреляционную зависимость от содержания аскорбиновой кислоты, зависимость между ними в пределах 0,121,0 мг влияния АК линейная.

Указанный метод автор сравнивает с двумя распространенными в практике быстрыми методами — методом йодометрического титрования и титрованием по Тильману. Точность характеризует рассеянием, то есть относительной процентной ошибкой. Математическое сравнение методов производилось с помощью проб<sup>F</sup> и<sup>t</sup>.

Установлено, что измерение содержания АК модельных растворов, а также растворов, содержащих белковую вытяжку, с 95% ной статистической надежностью может быть определено в тех же пределах ошибки как йодометрическим, так и рекомендуемым автором методом. Содержание АК цветного вишневого сока в результате исключения ингибирующих веществ, а также объективной оценки новый метод определяет правильно.